

Inclusion Body Disease hos boa- och pytonorm – diagnostiska metoder

Camilla Warnholtz

Handledare: Sándor Belák, Inst för biomedicin & veterinär folkhälsovetenskap,
Avd för parasitologi & virologi, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala

Bitr. handledare: Erik Ågren, Viltavdelningen SVA, Uppsala

Bitr. handledare: Irene Ahl, distriktsveterinär SJV, Gävle

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Innehållsförteckning.....	3
Abstract.....	3
Sammanfattning	3
Inledning	4
Material och metoder.....	7
Djuren	7
Försöksutformning	7
Anestesi.....	7
Blodutstryk.....	8
Leverbiopsiprovtagning genom celiotomi	8
Leverbiopsiprovtagning genom ultraljudsguidad nålbiopsi	10
Histologisk undersökning	12
Resultat	13
Blodutstryk.....	13
Inklusioner	13
Leverbiopsiprovtagning genom celiotomi	15
Leverbiopsiprovtagning genom ultraljudsguidad nålbiopsi	15
Diskussion.....	16
Litteraturstudie	18
Värdjur	18
Symptom.....	18
Etiologi	19
Inklusionskroppar.....	19
Patologi	20
Diagnostik	21
Tack	22
Referensförteckning	23

ABSTRACT

Inclusion body disease (IBD) affecting boas and pythons is a serious and common disease. Boas can be clinically healthy carriers, which makes control of the disease difficult. The causative agent has not yet been confidently identified, and therefore there are no serodiagnostic tests available. Today, histopathologic examination of tissue biopsies is the recommended antemortem diagnostic method, but there are several disadvantages. The objective of this study was to compare the sensitivity of two diagnostic methods – liver biopsies and blood smears, and to evaluate ultrasoundguided needle biopsy of the liver. Sixteen clinically healthy boas aging from 1,5 months to 4 years or more, and from different collections in Sweden were used in the study. Blood samples for blood smears were collected from all snakes, liver biopsies by celiotomy were performed on fourteen, and ultrasoundguided needle biopsies on five. The blood smears were stained with May-Grünwald-Giemsa, and the tissue samples were after preparation stained with hematoxylin and eosin. They were then examined with light microscopy for intracytoplasmic eosinophilic inclusion bodies in hepatocytes or blood cells. Typical IBD-inclusions were found in liver biopsies from four of the snakes, but no inclusions were found in blood smears from the same animals. Sampling by ultrasoundguided needle biopsy resulted in representative samples. In conclusion, a blood smear is not a reliable diagnostic alternative to identify IBD-positive snakes compared to liver biopsies, as liver biopsy by celiotomy or needle biopsy is a more sensitive method. Ultrasound guided needle biopsy is a less invasive technique, but has less control of procedure complications.

SAMMANFATTNING

Inclusion body disease (IBD) som drabbar boa- och pytonormar är en allvarlig och vanligt förekommande sjukdom. Boaormar kan vara kliniskt friska bärare, vilket medför att spridningen av sjukdomen är svår att kontrollera. Då man än inte har lyckats identifiera det agens som orsakar sjukdomen finns ännu inga serologiska diagnostiska metoder utvecklade. I dagsläget rekommenderas histopatologisk undersökning av vävnadsbiopsier som bästa diagnostiska metod på levande djur, men flera nackdelar finns. Syftet med denna studie var att jämföra sensitiviteten mellan två diagnostiska metoder - leverbiopsier och blodutstryk, samt att utvärdera ultraljudsguidad nålbiopsi från levern. Sexton kliniskt friska boaormar, från 1,5 månader till 4 års ålder eller mer, och från olika samlingar i Sverige ingick i försöket. Blodprov för blodutstryk togs på alla ormarna, leverbiopsier via celiotomi på fjorton och ultraljudsguidade nålbiopsier på fem. Blodutstryken färgades med May-Grünwald-Giemsa, och biopsierna preparerades och färgades med hematoxylin och eosin. De undersöktes därefter i ljusmikroskop efter intracytoplasmiska eosinofila inklusionskroppar i hepatocyter eller blodceller. Typiska IBD-inklusioner påvisades i leverbiopsier från fyra av ormarna, men inga inklusioner hittades i blodutstryk från samma djur. Slutsatsen är att blodutstryk inte är ett tillförlitligt diagnostiskt alternativ för att identifiera IBD-positiva ormar jämfört med leverbiopsier, eftersom leverbiopsi genom celiotomi eller nålbiopsi är en mer sensitiv metod. Ultraljudsguidad nålbiopsi är en mindre invasiv metod, men medför en sämre kontroll av eventuella komplikationer.

INLEDNING

Inclusion body disease (IBD) anses vara den viktigaste infektionssjukdomen hos boa- och pytonormar i fångenskap över hela världen idag (Jacobson et al, 2001). Den har varit känd sedan mitten av 1970-talet (Ahne, 1977; Schumacher et al, 1994), men dess betydelse har först på senare tid accentuerats. Sjukdomen har rapporterats från USA, Afrika, Europa och Australien, och på många olika arter inom familjen Boidae (boa- och pytonormar) i fångenskap (Schumacher et al, 1994; Carlisle-Nowak et al, 1998). Inklusioner lika de som ses vid IBD har även upptäckts på några icke-boida arter; palmhuggorm (*Bothriechis marchi*) (Raymond et al, 2001) och tre olika arter av kungssnok (*Lampropeltis getulus getulus* (Jacobson, 1996), *Lampropeltis getulus californiae* (Jacobson et al, 1980) och *Lampropeltis pyromelana* (Jacobson, 1989)). Det är okänt om IBD förekommer i det vilda.

De kliniska symptomen är mycket varierande. På kungsboaormar börjar symptomen oftast med regurgitering, ca en vecka efter utfodringstillfällena, följt av anorexi. I slutstadiet uppkommer CNS-avvikelser, t ex desorientering, obalans, sk "stargazing" och opistotonus (Schumacher et al, 1994). Ofta har djuren också stomatit och pneumoni (Jacobson et al, 2001). Boaormar kan bära infektionen asymptomatiskt och smitta andra djur, vilket gör det svårt att utrota sjukdomen. På pytonormar ses en perakut form, vanligen med CNS-symptom (Jacobson et al, 1999). De neurologiska symptomen är mer allvarliga och uttalade än hos boaormar, och inkluderar huvuddarrningar, inkoordination, desorientering, "head tilt", avsaknad av rättningsreflex när djuret placeras på rygg, opistotonus, progressiv förlust av motorfunktion (från i bakre hälften av ormen) och ibland paralyt (Carlisle-Nowak et al, 1998). Alla infekterade pytonormar utvecklar dock inte CNS-symptom och varje dåligt fungerande, kroniskt sjuk pyton bör anses IBD-misstänkt (Jacobson et al, 1999). Kronisk regurgitering ses vanligtvis inte hos pytonormar (Carlisle-Nowak et al, 1998). Sjukdomsförloppet kan vara längre hos boaormar (flera månader) än hos pytonormar (veckor-månader) (Carlisle-Nowak et al, 1998).

Orsaken till IBD misstänks idag vara ett virus, troligen ett retrovirus. Undersökning med elektronmikroskopi har visat viruspartiklar i hjärna, pankreas, njurar och i odlade njurceller från ormar med IBD. De höljeförsedda partiklarna var i genomsnitt 110 nm i diameter och liknade morfologiskt partiklar av C-typ inom familjen *Retroviridae* (Schumacher et al, 1994). Flera retrovirus har isolerats från kungsboaormar med IBD, men man vet inte om något av dem är det som orsakar IBD (personligt meddelande Elliott R. Jacobson, 2004). För att ta reda på detta behövs transmissionsstudier.

Hur IBD överförs mellan ormar är inte känt. Troligen sker det genom aerosoler eller via inredning kontaminerad med kroppsvätskor, samt eventuellt som en venerisk sjukdom (Jacobson et al, 1999). Att kvalster kan förekomma som vektor är sannolikt, då man upptäckt att infektion med ormkvalster, *Ophionyssus natricis*, var ett vanligt problem i många av samlingarna med IBD (Schumacher et al, 1994). Vertikal smitta är också en möjlighet, men om samtliga foster i sådana fall smittas är inte utrett (personligt meddelande Udo Hetzel, 2004; Jacobson et al, 1999). Det har rapporterats fall där modern testats positiv för IBD, men

avkomman inte varit positiv på test vid drygt ett års ålder (Jacobson et al, 1999; personligt meddelande Irene Ahl, 2004).

IBD karakteriseras av förekomsten av intracytoplasmatiska inklusioner, vilket gett sjukdomen dess namn. Inklusionerna ses huvudsakligen i celler av epitelialt ursprung, och påvisas oftast i bl a lever, pankreas, njurar och mag-tarmkanalens mukosa (ff a magsäckens), samt i hepatocyter och i neuroner i hjärna och ryggmärg (Garner och Raymond, 2004).

Materialet inuti inklusionskropparna består troligen av protein (Wozniak et al, 2000) eller både lipid och protein (Jacobson et al, 2001). Det finns inget bevis för att de innehåller infektiösa partiklar (Garner och Raymond, 2004).

Den provtagning som används för antemortem-diagnostik är ff a blodprov och biopsier. Blod används för biokemiska analyser, blodutstryk och blodcellsräkning. Biopsier rekommenderas från esophagus tonsiller, magsäckens mukosa, njurar eller lever (Jacobson et al, 1999). I en studie fann man inklusioner i 100 % av pankreas, 70 % av lever och njurar samt 30 % av gastrointestinalepitelet hos ormar som diagnostiserades med IBD (Jacobson et al, 1999). Medan påvisande av karakteristiska inklusioner är diagnostiskt för sjukdomen, innebär det inte att ormen är fri från IBD om man inte hittar några inklusioner (Jacobson et al, 2001). Tills det sjukdomsorsakande agenset har isolerats och karakteriserats fullständigt och serologiska eller molekylärbiologiska tekniker såsom PCR har utvecklats, är det svårt att identifiera djur som exponerats och är kliniskt friska bärare. Det är inte heller känt om en orm kan sprida smitta innan inklusionskroppar har bildats. En indirekt ELISA-test har utvecklats för användning hos kungsboa, men ett antigen behövs. Försök pågår att sekvensera ett IBD-specifikt 68-kd protein som hittats i inklusionerna, för att se om detta kan användas som ett antigen i testen (personligt meddelande Elliott R. Jacobson, 2004).

Precis som för andra virala infektioner hos reptiler finns det ingen specifik behandling av IBD, och även med understödjande behandling anses sjukdomen dödlig (Carlisle-Nowak et al, 1998). Eftersom man tror att alla infekterade ormar är kroniska smittbärare och det inte finns någon effektiv behandling, samt att man aldrig har sett någon sjuk orm tillfriskna, bör ormar med diagnosen IBD avlivas (Schumacher et al, 1994). Terrarierna bör desinficeras och därefter lämnas ute för exponering i solljus ett par veckor. Rekommenderade desinfektionsmedel är klorkalk (natriumhypoklorid, 1:32) alternativt klorhexidin. Träterrarier bör kasseras. Generellt är retrovirus inte tåliga och överlever inte länge i miljön. Om IBD diagnostiseras i en grupp av ormar, bör man isolera hela samlingen. Inga ormar får lämna samlingen och inga tas dit, inte ens om det är en art som inte anses drabbas av IBD. Noggranna matnings-, hanterings- och rengöringsrutiner bör användas. Djuren bör undersökas och eventuella kvalsterangrepp behandlas. Samtliga ormar provtages med lämpliga diagnostiska metoder, varefter positiva djur avlivas och "negativa" sätts i karantän i minst 3 - 6 månader. Man bör vara medveten om att inte ens ett halvår med karantän avslöjar alla latent infekterade boaormar. De sk negativa är ett problem eftersom de inte kan diagnostiseras som säkert negativa innan andra diagnostiska, t ex serologiska metoder finns tillgängliga. Exponerade boa- och pytonormar bör aldrig sättas tillbaka till en aktiv avelsgrupp. IBD anses nu vara en mycket utbredd sjukdom, och ett intensivt arbete behövs för att få kontroll över sjukdomen. (Jacobson et al, 1999)

Det finns fortfarande många kunskapsluckor när det gäller IBD, och för att fylla dessa behövs mer forskning. Det viktigaste är att isolera infektiösa ämnen för att därefter kunna utveckla ett serologiskt diagnostiskt test. Först då kan det bli möjligt att begränsa spridningen av sjukdomen.

Syftet med denna studie var att jämföra sensitiviteten mellan två diagnostiska metoder - leverbiopsier och blodutstryk, samt att utvärdera ultraljudsguidad nålbiopsitagning. Resultatet är tänkt att ge en vägledning vid val av metod för att diagnostisera IBD. I dagsläget rekommenderas vävnadsbiopsier som bästa diagnostiska metod, men flera nackdelar finns och behovet av enkel och säker diagnostik är stort.

MATERIAL OCH METODER

Djuren

Djurförsöksetiska nämnden har godkänt försöken i denna studie. Sexton kungsboaormar (*Boa constrictor*) ingick i försöket. Alla djur var kliniskt friska med undantag för att en av ormarna hade lindriga hudskador orsakade av råttbett, under avläkning. Ingen orm var smittad med ormkvalster.

Fjorton av de sexton djuren var *Boa constrictor constrictor* (vanlig kungsboa), vilka införskaffades från maj till augusti 2004 från privatpersoner i mellersta och södra Sverige. Sex av dem var juvenila 1,5 - 5 månader gamla, varav några var syskon. Juvenilerna kom direkt från uppfödarna. Åtta ormar var vuxna djur som ägarna av olika anledningar inte ville ha kvar. Båda könen fanns representerade. Tiden innan försöket förvarades ormarna individuellt i polypropylenlådor av lämplig storlek utrustade med en vattenskål, ett gömställe, tidningspapper som bottensubstrat och med en värmematta under halva bottenytan. Lådorna förvarades i ett reptilrum med en omgivningstemperatur på 28°C och med en 12:12 timmars ljus-mörker cykel. Rengöring och desinficering utfördes mellan all hantering av olika djur och deras tillbehör. Vid försöket var de svälta sedan två veckor. Ett dygn före försöket transporterades ormarna med bil 900 km till försöksplatsen.

Två av de sexton djuren var *Boa constrictor occinentalis* (argentinsk kungsboa), en hona och en hane. Båda dessa hade knappt två månader tidigare diagnostiserats som IBD-positiva efter histopatologisk undersökning av leverbiopsier. De hade hela tiden varit kliniskt friska och transporterades direkt från deras privata hem till försöksplatsen.

Försöksutformning

Blodprov för utstryk skulle tas på alla sexton djuren. På de fjorton vanliga kungsboaormarna skulle det tas leverbiopsier via celiotomi. På de två argentinska kungsboaormarna och på tre vanliga kungsboaormar skulle det tas nålbiopsier under ultraljudsguidning. Vid provtagningen skulle de argentinska boaormarna varken sövas eller lokalbedövas.

Vid den mikroskopiska undersökningen av biopsimaterial och blodutstryk var proven avidentifierade, så att undersökningarna utfördes blint.

Anestesi

Varje orm sövdes dissociativt med ketamin (Ketalar[®] eller Ketaminol[®]) 50 mg/kg intramuskulärt fördelat på minst sex ställen utmed kraniala hälften av ryggmuskulaturen. Kanyler 0,6 × 25 mm användes vid alla injektioner. Efter 20 minuters narkosinduktion gavs lokalanestesi i form av lidokain (Xylocain[®] 10 mg/ml utan adrenalin) 1-2 ml/orm subkutant utmed tänkt snittlinje. Lokalanestesin fick verka i minst 5 min innan incisionen utfördes.

Blodutstryk

Ett snitt med skalpell gjordes genom dorsala gomvenen eller dess förgreningar i munhålan och blod samlades med ett kapillärrör (bild 1). Blodet ströks ut på objektsglas som fick lufttorka.

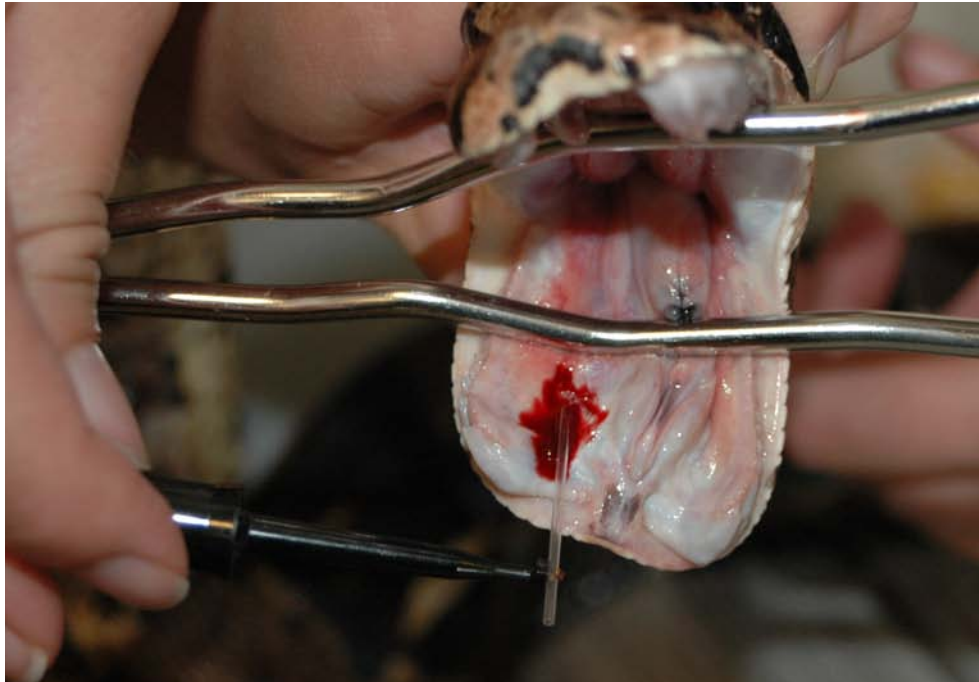


Bild 1. Blodprovstagning på kungsboa. Blodet från det snittade kärlet samlas upp med ett kapillärrör.

Leverbiopsiprovtagning genom celiotomi

Platsen för snittet mättades ut genom att uppskatta leverns lokalisation (se bild 2). Mitten av avståndet mellan skallbas och anal markerades med kirurgisk tejp på ormens hud. Ytterligare en tejpbit placerades ca 10 centimeter kranialt om den förra. Mittemellan de två markeringarna på laterala kroppssidan vid övergången mellan fjäll och bukplåtar, lades ett ca 4 cm långt snitt med skalpell genom hud och bukvägg. Med hjälp av fingrarna och ibland en kirurgisk pincett samt en sårhake lyftes levern fram och Vena cava lokaliserades (bild 3). Med en kirurgisk sax klipptes en trekantig ca $6 \times 4 \times 4$ mm bit av levern ut, från fria kanten in mot Vena cava, som löper centralt längs med levern (bild 4). Varje biopsi lades i en separat uppmärkt behållare med 10 % buffrad formalin. Såret förslöts med ett lager fortlöpande sutur genom hud och bukvägg. Till de stora ormarna användes Supramid 0, till de mindre Supramid 2-0 med skärande nål.

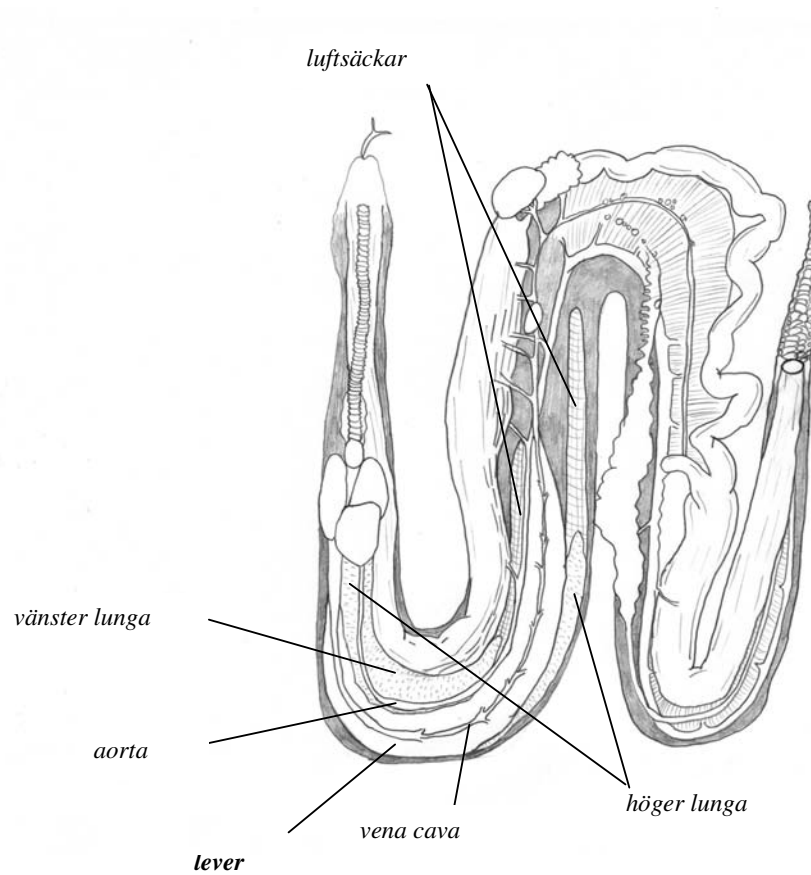


Bild 2. Översikt av anatomin hos orm. Notera leverns nära läge till aorta, lungor och luftsäckar och hur Vena cava löper genom organet.



Bild 3. Leverns lokalisering intill lungorna och med Vena cava som löper längsmed hela organet.



Bild 4. En biopsi av levern klipps ut med sax, utan att skada intilliggande strukturer.

Leverbiopsiprovtagning genom ultraljudsguidad nålbiopsi

Leverns lokalisation mättes ut enligt ovan. Ultraljudsproben (konvex 6,5 MHz) från en Medison SA 600V anslades vinkelrätt mot huden med ultraljudsgel emellan och riktades om tills en tydlig transversal snittbild av levern erhöles på ultraljudsapparatens skärm (bild 5). Ca 10 mm vid sidan om proben lades ett snitt genom huden med skalpellblad och in via snittet trycktes en biopsikanyl (1,20 × 70 mm) i riktning mot levern (bild 6). Via ultraljudsskärmen kontrollerades att biopsinålen var placerad i levern, vilken penetrerades ett flertal gånger under det att ett undertryck skapades i biopsinålen genom att aspirera med sprutan. Under fortsatt undertryck drogs nålen ut ur kroppen och biopsierna överfördes till en separat uppmärkt behållare med 10 % buffrad formalin.

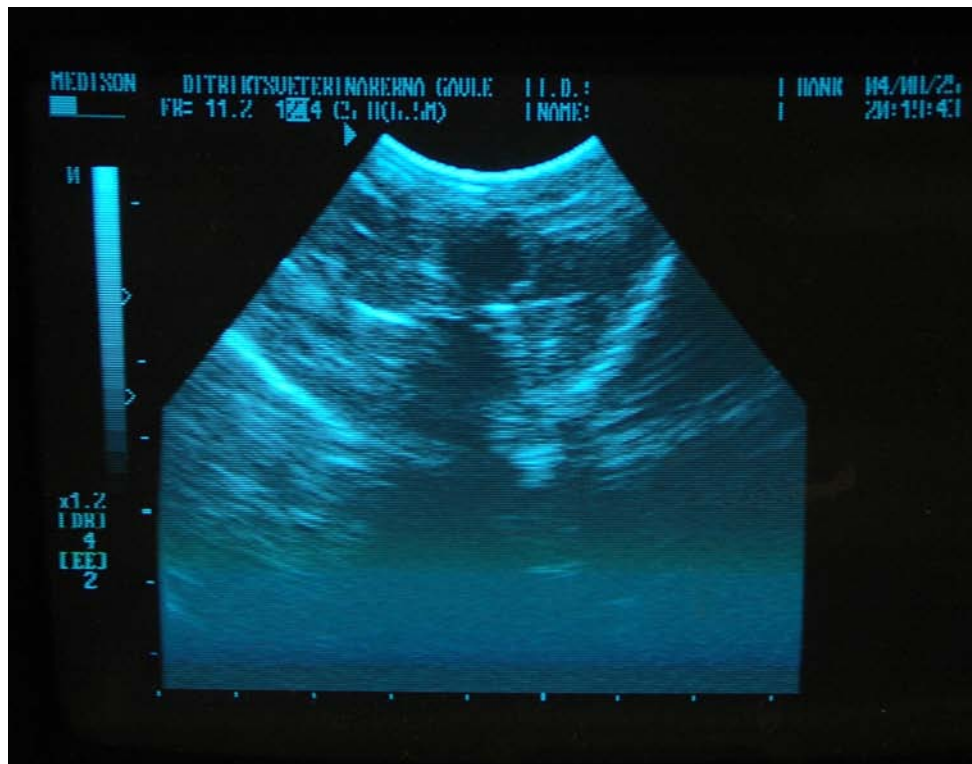


Bild 5. Levern och Vena cava på ultraljudsapparatens bildskärm.



Bild 6. Leverbiopsitagning med biopsikanyl under guidning av ultraljudsproben.

Histologisk undersökning

Leverbiopsierna fixerades i 10 % buffrad formalin, trimmades vid behov, dehydrerades, bäddades in i paraffin, snittades till ca 5 µm, monterades på objektglas och färgades med hematoxylin och eosin (H&E). Varje snitt undersöktes med ljusmikroskop i 20-100 ggr förstoring i minst 15 minuter. Som positivt prov bedömdes de med ett flertal typiska homogena starkt eosinofila intracytoplasmatiske runda till ovala 3-10 µm stora inklusioner.

Blodutstryken färgades med May-Grünwald-Giemsa och undersöktes med ljusmikroskop i 20-100 ggr förstoring i minst 20 minuter.

RESULTAT

Blodutstryk

Inga IBD-inklusioner hittades i något av utstryken (se tabell 1).

Tabell 1. Provtagningsmetod och resultat.

Individ A och B är argentinska kungsboaormar.

Neg = inga inklusioner påvisade, pos = inklusioner påvisade.

Individ nr	Information om individen			Diagnostisk metod		
	Ålder	Vikt (g)	Släktskap, kontakt	Celiotomi	Nålbiopsi	Blodutstryk
1	-	6500		neg	neg	neg
2	-	900		neg	-	neg
3	-	5900	kontakt med 4	neg	neg	neg
4	-	3800		neg	neg	neg
5	2 år	1100	kullsyskon dött i neurologisk sjukdom	neg	-	neg
6	1,5 år	950	kontakt med 5	neg	-	neg
7	4 år	950		neg	-	neg
8	4 år	650		neg	-	neg
9	3,5 mån	93	kullsyskon med 10	neg	-	neg
10	3,5 mån	96		neg	-	neg
11	3 mån	105	kullsyskon med 12	pos	-	neg
12	3 mån	105		pos	-	neg
13	1,5 mån	48	kullsyskon med 14	neg	-	neg
14	1,5 mån	55		neg	-	neg
A	-	-		-	pos	neg
B	-	-		-	pos	neg

Inklusioner

I leverbiopsier från fyra av de sexton boaormarna påvisades intracytoplasmatiska inklusioner typiska för IBD, varav två provtagna genom celiotomi (se bild 7) och två genom nålbiopsi (se bild 8). Två av dessa var de argentinska kungsboaormar som knappt två månader tidigare diagnostiserats positiva för IBD, men som fortfarande inte hade utvecklat några kliniska symptom. I biopsier från två andra ormar hittades ett mindre antal 1-2 µm runda eosinofila kroppar. Dessa liknade IBD-inklusioner, men återfanns inte i hepatocyternas cytoplasma utan i sinusoider, ibland i Kupffers celler, varför biopsierna bedömdes som negativa avseende IBD (personligt meddelande Elliott R. Jacobson, 2004; personligt meddelande Erik Ågren, 2004) (se bild 9).

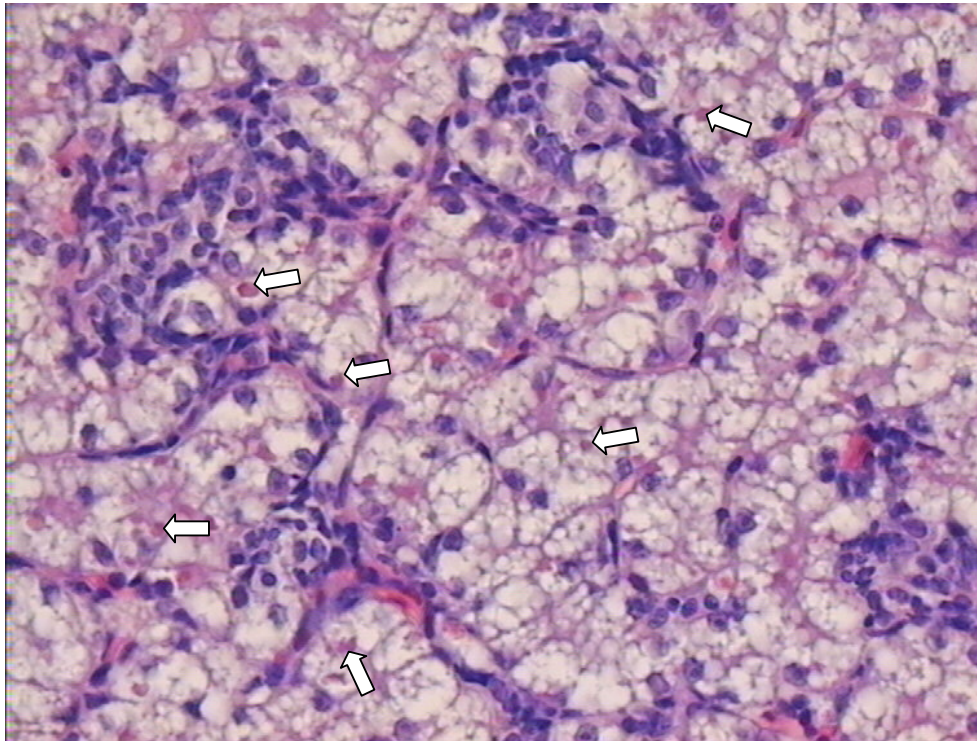


Bild 7. Leverbiopsi från orm nr 11: eosinofila intracytoplasmatiska inklusioner i hepatocyter (se pilar).

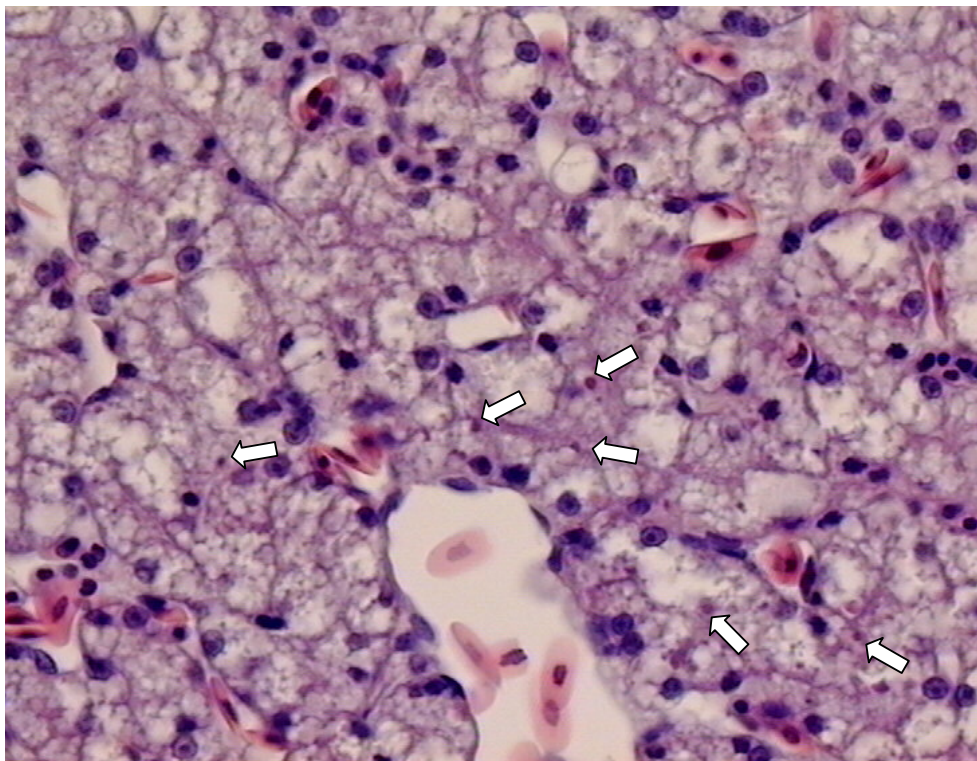


Bild 8. Nålbopsi från levern på orm A: eosinofila intracytoplasmatiska inklusioner i hepatocyter (se pilar).

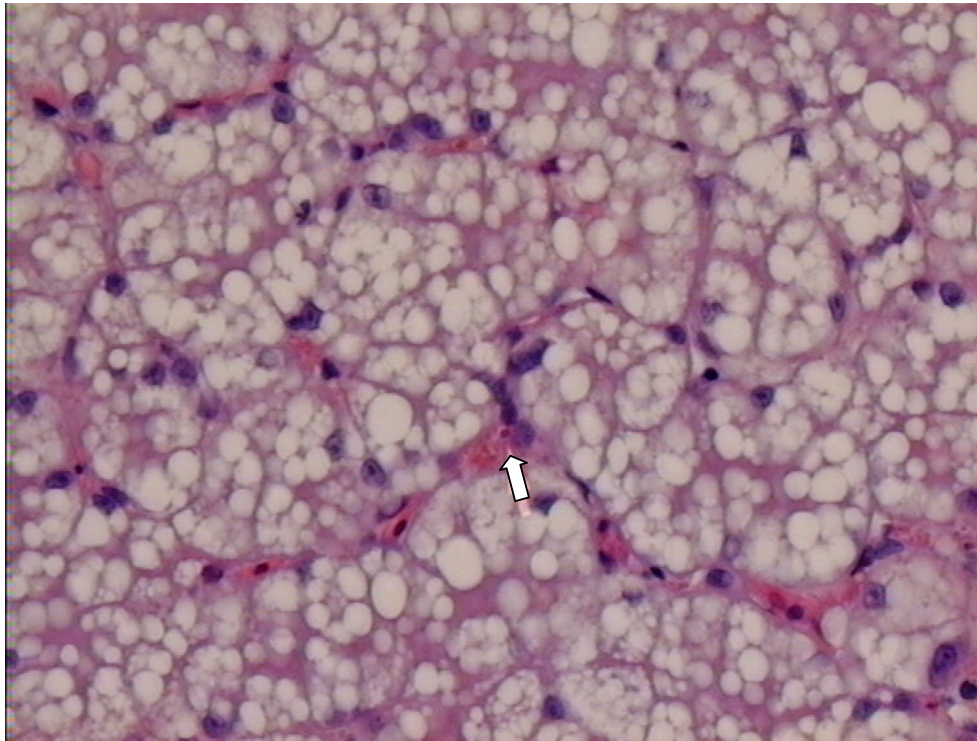


Bild 9. Leverbiopsi från orm nr 4: en 1-2 μ m rund eosinofil kropp i en sinusoid (se pil).

Leverbiopsiprovtagning genom celiotomi

Samtliga fjorton ormar som provtogs genom celiotomi överlevde ingreppet. På de sex minsta ormarna var levern väldigt liten i förhållande till Vena cava, varför provtagningen var svår. På de fyra ormar som vägde under 100 gram skadades Vena cava så att en mindre blödning uppstod, men de överlevde ingreppet utan att vidare åtgärder behövdes. Alla ormar utom en åt föda 10 dagar efter operationen. Den som inte ville äta ömsade skinn och började därefter äta.

Leverbiopsiprovtagning genom ultraljudsguidad nålbiopsi

Ormarna reagerade inte nämnvärt på ingreppet trots att de inte fått sedering eller analgesi. Det de reagerade mest på vid provtagningen var det lilla snittet som gjordes i huden. Vid själva provtagningen, när biopsinålen perforerade levern, gjorde de inte mer motstånd än generellt av själva fasthållningen.

DISKUSSION

IBD är troligtvis ett mycket större problem i Sverige idag än vad vi känner till. I dagsläget finns det ingen känd prevalens för sjukdomen. De sjukdomar som är smittsamma och där det förekommer subkliniska smittbärare är mycket svåra att utrota. Enda säkra sättet kan vara "stamping out", dvs att avliva alla djur som bär på infektionen. För att veta om ett djur är infekterat behövs tillförlitlig diagnostik. Idag anses endast histopatologisk bedömning av vävnadsbiopsier som diagnostisk, men metoden innebär ett visst kirurgiskt ingrepp. Med t ex en serologisk diagnostisk metod skulle det vara enklare, mindre riskfyllt och billigare att provta ett stort antal djur, och därmed att kunna bedriva en effektivare bekämpning av sjukdomen.

Fördelarna med provtagning genom celiotomi är att man har en överblick över lever och intilliggande organ, så att risken att skada Vena cava eller andra strukturer blir mindre, och att man kan upptäcka och stoppa en eventuell blödning. Nackdelarna är att det är ett större ingrepp under narkos, att det innebär en post-operativ infektionsrisk och att suturtagning krävs om icke resorberbart suturmateriäl används.

Fördelarna med nålbiopsi är att ingen narkos behövs och att det är ett mindre invasivt ingrepp. Det visade sig vara lätt att få representativa prover från levern med hjälp av en nålbiopsi.

Nackdelen är risken att ofrivilligt punktera större kärl eller andra strukturer såsom lungor, och att man behöver ha tillgång till och kunskap om användning av ultraljud.

Positiva och osäkra prov undersöktes även i fluorescensmikroskop. Positiva prov visade på en svag fluorescens hos inklusionskropparna. Fluorescensen var dock inte tillräckligt stark för att metoden kan anses underlätta identifieringen av positiva fall. Biopsisnitt från positiva djur färgades också med Giemsa och PAS, men dessa färgningar visade sig dåligt framhäva inklusionerna. De mycket små och runda eosinofila kropparna som fanns i sinusoider på orm nr 3 och 4 skiljde sig från IBD-inklusioner avseende storlek, placering och antal. De var inte heller fluorescerande vid undersökning i fluorescensmikroskop. Värt att notera är att orm nr 3 och 4 levte tillsammans under flera år.

De metoder och den utrustning som användes vid försöket fungerade till synes bra, men för att utföra sövning och provtagning optimalt enligt litteraturen är en del förändringar önskvärda.

Analgetika bör ges preoperativt, t ex carprofen (Rimadyl®) 1-4 mg/kg. Värme-matta el liknande bör användas för att upprätthålla artens specifika optimala temperaturintervall (POTZ) före, under och efter anestesi. För att erhålla tillräckligt narkosdjup av ketamin bör doseringen vara 55-90 mg/kg (Carpenter et al, 2001). Suturen bör vara utåtvikande, eftersom reptilhud vänder sig inåt mot såret vid läkning (Mader, 1996).

Eftervården innefattar ett varmt uppvaknande under översikt, övervakning av ev postkirurgiska komplikationer såsom sårinfektioner, samt suturtagning efter 6-8 veckor.

För att få bättre kvalitet på preparaten för histologisk undersökning bör man låta leverbiopsierna svalna till rumstemperatur i ca 1–2 minuter, innan de fixeras i formalin (personligt meddelande Erik Ågren, 2004).

Genom att ge lokalbedövning med en fin kanyl skulle ormarna vara ännu mindre berörda av nålbiopsitagningen. Vidare undersökning av ultraljudsguidad nålbiopsitagning skulle vara intressant, t ex för att utvärdera risken för komplikationer såsom t ex blödningar. Ytterligare kunskap om sjukdomens prevalens, möjliga andra värdar, spridning och patologi vore också värdefullt.

LITTERATURSTUDIE

Värddjur

I slutet av 1970- och början av 80-talet sågs IBD oftare på tigerpyton (*Python molurus bivittatus*) än på kungsboa. Detta kan bero på att tigerpyton då var mer vanligt förekommande än boaormar. Tigerpyton är fortfarande vanliga, men sjukdomen verkar trots det inte förekomma så ofta på denna art nuförtiden. Förklaringar till detta kan vara att virusets virulens har förändrats, att de ormar som överlevt efter mitten av 80-talet har utvecklat resistens, eller att agenset orsakar andra kliniska symptom, som t ex den kroniska respirationssjukdom som ses på flera arter av pytonormar (Jacobson et al, 1999).

Kungspyton (*Python regius*) verkar sällan drabbas, men om det beror på en viss resistens eller underrapportering är okänt. Rosenboa (*Lichanura sp.*) är en art av boiderna som uppfattas som resistent, eftersom inga fall av IBD har rapporterats på dessa ormar, trots att många troligen håller dem i samma samling som kungsboaormar. (Jacobson et al, 1999)

Mader (Jacobson et al, 1996) menar att IBD trots allt kan förekomma på icke-boida arter, men att symptomen kanske inte liknar IBD så som vi känner till dem. Dessutom menar han att vi associerar IBD med eosinofila inklusioner hos boiderna, och att sjukdomen kanske inte orsakar samma patologi hos andra arter. I nästan alla fall av IBD hos tigerpyton, hölls dessa i samma rum som kungsboaormar (Schumacher et al, 1994). I en del av fallen var även boaormarna sjuka, medan de i andra fall var kliniskt friska (Schumacher et al, 1994). Man menar att kungsboa har större resistens mot klinisk IBD än andra boider (Wozniak et al, 2000). Kanske är kungsboa naturlig värd för det agens som orsakar IBD, medan pytonormar kan fungera som avvikande värddjur (Schumacher et al, 1994). Om en serologisk test utvecklas kan undersökningar i ormarnas ursprungsland avslöja vilken art som är reservoar (Schumacher et al, 1994).

I en studie (Garner och Raymond, 2004) undersöktes 515 boaormar, 301 pytonormar och 20 anakondor, där 90 boaormar hade IBD, men inte en enda pyton eller anakonda. Det har rapporterats att en annan morfologisk manifestering av IBD kan förekomma på pytonormar, där inflammation dominerar och inklusioner är sällsynt. Det verkar dock osannolikt att pyton skulle ha en annorlunda manifestering av sjukdomen än boa och palmhuggorm, eftersom pyton är mer nära relaterade till boa än vad palmhuggorm är, och morfologin hos palmhuggorm är identisk med den hos boa. Författarna till artikeln tror att IBD är ovanlig till sällsynt på pytonormar, och att det är möjligt att andra sjukdomsalstrande agens som t ex paramyxovirus kan förväxlas med IBD på pytonormar. (Garner och Raymond, 2004)

Symptom

Regurgitering beskrivs ofta som ett av de vanligaste symptomen. Klingenberg skriver dock att detta symptom diskuterats i endast ett av de över hundra IBD-fall han diagnostiserat. Författaren anser de mest typiska akuta symptomen på boaormar vara mycket lindriga huvuddarrningar, minskat tungspelande och håglöshet. Han menar att man inte ska räkna med neurologiska symptom på

boaormar, varken i akut eller i kronisk fas. Det är vanligare med extremt svaga neurologiska symptom i den akuta fasen än med några sådana symptom överhuvudtaget i den kroniska fasen. Vidare är anorexi, håglöshet, viktförlust och dehydrering mer karakteristiskt för den kroniska fasen, även om det börjar i den akuta fasen. Efterhand som sjukdomen fortskrider är det vanligare med sekundära bakterieinfektioner, som t ex infektiös stomatit, pneumoni, nekrotiserande dermatit och abscesser. (Jacobson et al, 1999)

Mader (1996) menar att det är svårt att skilja mellan akut och kronisk sjukdom och att det man ser oftast är en akut manifestering av en infektion som resulterat från en kronisk och försvagande sjukdom. Han har sett regurgitering och kaudal paralyt på unga kungsboaormar, medan äldre individer har infektioner som inte svarar på behandling, vanligtvis med respiratoriska symtom.

Etiologi

Viruspartiklar har enbart vid enstaka tillfällen påvisats när celler med inklusionskroppar undersökts med elektronmikroskopi (Schumacher et al, 1994). Man har i IBD-infekterad vävnad hittat viruspartiklar som misstänks vara retrovirus, men flera studier har visat på skillnader vid jämförelse med retrovirus. Exempel på detta är att det nya viruset replikerades vid 25°C (Jacobson et al, 2001), en suboptimal temperatur för de flesta däggdjurs- och fjäderfävirus, och att viruspartiklarna knoppas av från intracytoplasmatiske membran (Schumacher et al, 1994), medan de flesta retrovirus knoppas av från cellväggen.

Intraperitoneala och subkutana injektioner med vätska innehållande mogna viruspartiklar (supernatant från odlade njurceller från en infekterad boaorm) på unga pythonormar, har resulterat i kliniska symptom och mikroskopiska fynd som vid IBD (Schumacher et al, 1994). Även boaormar har inokulerats med infektiöst material från en IBD-positiv boa och utvecklade de typiska inklusionerna i hepatocyter 10 veckor efter injektionerna, men hade ett år efter injektionerna inte utvecklat några kliniska symptom (Wozniak et al, 2000).

Flera retrovirus har isolerats från boider, men dessa agens har inte visat sig orsaka IBD efter experimentell inokulering på boaormar (Carlisle-Nowak, 1998; Huder et al, 2002). Alla retrovirus hittills identifierade på ormar är från djur med neoplasier (Schumacher et al, 1994). Om viruset som orsakar IBD på boider bekräftas vara ett retrovirus, kommer det att vara den första systemiska retrovirala sjukdomen på reptiler som inte är associerad med neoplasier.

Inklusionskroppar

På kungsboa har inklusioner varit vanligast i njurar, pankreas och lever, medan de på tigerpython varit vanligast i CNS (Schumacher et al, 1994). Inklusionerna kan variera i antal mellan olika ormar, från några få inklusioner i ett organ till att de förekommer i flera organ (Jacobson et al, 2001). Histokemiskt är inklusionerna eosinofila med HE-färgning, PAS-negativa (Wozniak et al, 2000), djupblå med Giemsa (Schumacher et al, 1994), och positiva vid fluorescensmikroskopi. Vid elektronmikroskopi (TEM) uppträder inklusionerna som små elektrontäta enheter som tunnas ut vid periferin och kondenseras centralt (Jacobson et al, 2001).

Antalet, storleken och densiteten på inklusionskropparna ökar med infektionens duration. Maximala diametern på inklusionskropparna är 5-6 μm . Inklusionskroppar mindre än 2 μm består av intracytoplasmatiska ansamlingar av granulärt elektrontätt material som inte är membranbundet. Större inklusioner (3-6 μm) består av membranbundna ansamlingar av amorft till granulärt elektrontätt material blandat med membranlika fragment. Denna kombination tyder på att de större inklusionerna har ett fagolysosomalt ursprung. Inklusionerna innehåller ett antigenet särskiljande IBD-specifikt 68-kd protein, vilket misstänks vara viralt. Detta är specifikt för infekterad inklusionspositiv vävnad, och monoklonala antikroppar riktade mot proteinet märker ut inklusionskropparna. (Wozniak et al, 2000)

Olika teorier har lagts fram om vad inklusionskropparna har för ursprung. Det kan vara en överproducerad och/eller dåligt nedbruten viruskomponent som ansamlas i värdcellens cytoplasma (Wozniak et al, 2000), en biprodukt från cell-metabolismen som ansamlats pga dålig cellfunktion (storage disorder) (Garner och Raymond, 2004) eller vara previralt material som behövs för replikation (Jacobson et al, 2001).

Stora eosinofila intracytoplasmatiska kroppar liknande de som förekommer vid IBD verkar vara unika för boider och annorlunda jämfört med de inklusioner som beskrivits i litteraturen för övriga ormar (Schumacher et al, 1994) och för andra retrovirala infektioner (Wozniak et al, 2000). En av dem som forskat mest på IBD (Elliot R. Jacobson) har undersökt vävnader från ett stort antal icke-boida ormar och har på dessa aldrig sett likadana inklusioner (Schumacher et al, 1994). Även hos personer infekterade med humant immunbrist virus (HIV) har ansamling av partiklar i intracytoplasmatiska vakuoler observerats, vilket gjort att IBD ibland kallats "boa-aids".

Andra strukturer som bildar inklusioner är t ex cellulärt debris, infektiösa agens samt fagocyterat främmande material (Garner och Raymond, 2004). Det som kan misstas som inklusioner är tvärsnittade heterofiler utan synlig kärna, apoptotiska kroppar (Councilman bodies) och sexuella granula i njurvävnad från handjur (personligt meddelande Erik Ågren, 2004).

Patologi

De histopatologiska fynden vid IBD, utöver inklusioner, har visats vara t ex multifokala nekroser och mononukleär leukocytinfiltration i flera organ, samt vakuolisering av acinära celler i pankreas, tubulär nekros i njurar, thymusatrofi, fibros och atrofi av lymfoid vävnad samt granulomatös pneumoni (Schumacher et al, 1994). Den allra tydligaste patologiska förändringen var vakuolisering och balloniserande degeneration av hepatocyter, ofta med förstörad blek vesikulär kärna (Schumacher et al, 1994). Vakuolisering av hepatocyter var tydligt 10 veckor efter experimentell infektion (inokulering) och graden av vakuolisering ökade med durationen av infektionen (Wozniak et al, 2000).

Histologisk undersökning av nervvävnad har visat stora skillnader mellan boa och pyton. Det inflammatoriska svaret var mer uttalat hos tigerpyton än hos kungsboa, medan förekomsten av intracytoplasmatiska inklusioner i nervvävnad var mer omfattande hos boormarna. Detta är en intressant observation, eftersom CNS-

störningarna oftast är mer uttalade hos pyton. Både boa och pyton hade non-suppurativ meningoencephalit med neurondegeneration, glios och demyelinsering. Påverkade neuron var runda och svullna och med förlorad Nissl substans. (Schumacher et al, 1994)

Diagnostik

Differentialräkning av blodceller kan vara av värde som diagnostik, då det inte är ovanligt med leukocytos (ofta mer än 30,000 och upp till 100,000 celler/ μ l) med lymfocytos i det akuta stadiet. Till följd av immunosuppressionen orsakad av virusinfektionen, går dock den vita blod bilden ner till det normala relativt snabbt och ökningen upptäcks oftast aldrig. Toxiskt förändrade leukocyter kan också vara en indikation på den inflammatoriska processen (Jacobson et al, 1999).

Kemiska parametrar, såsom ASAT, LDH, amylas, lipas, biliverdin samt ev biliverdinuri kan förändras, men referensvärden saknas för många ormarter. Leverenzymvärden kan troligen vara värdefullt att följa eftersom levern är ett primärställe för inklusioner. Amylas och lipas är också av intresse, då en studie av Schumacher visade att pankreas är det enda organ som var förändrat hos 100 % av de djur som ingick i studien. (Jacobson et al, 1999)

De hematologiska och klinkemiska värdena skiljer sig mellan akut respektive kroniskt infekterade ormar. Vid akut infektion ses leukocytos, relativ lymfocytos (lymfopeni vid kronisk inf), lägre totalprotein och globulinvärden och signifikant högre ASAT-värden än vid kronisk infektion. (Schumacher et al, 1994)

Blodutstryk kan färgas med May-Grünwald-Giemsa (personligt meddelande Erik Ågren, 2004), Wright's/Giemsa, Wright's eller Diff quick (Jacobson et al, 1999) och undersökas i ljusmikroskop efter inklusioner i både vita och röda blodkroppar. Antalet celler med inklusioner är dock endast ca 1 % i typfallet (Jacobson et al, 1999). Cytologi bedöms inte vara ett idealt sätt att diagnostisera IBD. Det är lättare att missa inklusioner och att missa andra strukturer för inklusioner, än på biopsier (Garner och Raymond, 2004). Klingenberg (Jacobson et al, 1999) anser att man bör följa upp ett positivt blodutstryk med leverbiopsier för verifiering. Även cytologisk undersökning av leveraspirat har sämre sensitivitet än biopsier från samma organ, eftersom hepatocyterna tenderar att lysera under aspirationen (Garner och Raymond, 2004). Magsäckssköljning har också provats som diagnostisk metod, men antalet celler som följer med är otillräckligt och objektglaset behöver prepareras omgående för att undvika osmotiska artefakter (Garner och Raymond, 2004).

Leverbiopsi anses idag ge den säkraste diagnostiken och en studie visar att en utskuren bit eller perkutan biopsi är bästa metoden. Endoskopiskt tagna biopsier av magsäcksslemhinnan ger också diagnostiska prover, men kräver specialutrustning och kan vara svår att utföra på patienter som är för små eller stora för utrustningen. Biopsitagning från andra vävnader, som pankreas och njurar, är mer invasivt än vad som krävs för diagnos. Hudbiopsi är inte lika sensitivt som leverbiopsi, men kan förbättras genom att ta mer än en hudbiopsi. (Garner och Raymond, 2004)

Inklusionspositiva prov borde eventuellt utvärderas med ytterligare diagnostiska metoder, såsom elektronmikroskopi, innan diagnosen IBD ställs, eftersom flera olika skador kan orsaka bildning av likartade inklusionskroppar (Wozniak et al, 2000). Erhålls negativa biopsier från en misstänkt orm bör djuret sättas i karantän i 3-6 månader, och därefter upprepas biopsitagningen, och prover tas från flera olika organ (Jacobson et al, 1999). Monoklonala antikroppar har producerats mot ett IBD-virus associerat protein (68-kD), vilka borde kunna användas som reagent vid immunohistokemisk differentiering av IBD-inklusioner från andra ickeviralala inklusionskroppar (Wozniak et al, 2000).

Om det gäller värdefulla djur, kan det vara befogat att utföra en experimentell överföring av blod från en misstänkt orm till en naiv pyton som inte utsatts för infektionen. Om det misstänkta blodet är positivt, bör man se neurologiska symptom på pytonormen inom 3-6 månader (Jacobson et al, 1999).

TACK

Erik Ågren för all den tid du lagt ner och för ditt fantastiska engagemang som handledare. Utan dina ovärderliga synpunkter, ditt stöd i förtvivlade stunder och dina ”sparkar i baken” hade jag inte klarat det.

Irene Ahl för all erfarenhet och handledning vid utförandet av operationer och provtagning, dessutom med en stor portion humor.

Sándor Belák för all din tid och goda handledning, och för att du med stor inlevelse tog dig an en studie på detta ”udda” djurslag.

Bo Runsten för hjälp med litteratur.

Alla som skänkt ormar, för att ni bidrar till kunskap om en mycket viktig sjukdom.

Furuviksparken för mycket trevligt bemötande och för att vi fick bo i er fina park under de dagar provtagningen utfördes.

Patrik för att du alltid finns till hands vid min sida, och dessutom står ut med att ha ytterligare 14 ormar boende i vårt hus.

REFERENSFÖRTECKNING

- Ahne, W. 1977. Bei reptilian vorkommende viren. In: Reinbach-Klinke, H. H. *Krankheiten der Reptilien*. Gustav Fischer Verlag, Sid 13-29.
- Carlisle-Nowak, M. S., Sullivan, N., Carrigan, M., Knight, C., Ryan, C. och Jacobson, E. R. 1998. Inclusion body disease in two captive Australian pythons (*Morelia spilota variegata* and *Morelia spilota spilota*). *Australian Veterinary Journal*, 76(2): 98-100.
- Carpenter, J. W., Mashima, T. Y. och Rupiper, D. J. 2001. *Exotic Animal Formulary*. W. B. Saunders Company.
- Garner, M. M. och Raymond, J. T. 2004. Methods for diagnosing Inclusion Body Disease in snakes. *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 21-25.
- Huder, J. B., Böni, J., Hatt, J-M., Soldati, G., Lutz, H. och Schüpbach, J. 2002. Identification and characterization of two closely related unclassifiable endogenous retroviruses in pythons (*Python molurus* and *Python curtus*). *Journal of virology*, 76(15): 7607-7615.
- Jacobson, E.R., Seely, J.C. och Novilla, M.N. 1980. Lymphosarcoma associated with virus-like intranuclear inclusions in a California king snake (Colubridae: *Lampropeltus*). *Journal of the National Cancer Institute*, 65(3): 577-583.
- Jacobson, E.R. 1989. Nonviral inclusions of reptiles. *International Colloquium on the Pathology of Reptiles and Amphibians*, 3: 99-100.
- Jacobson, E.R. 1996. An update on inclusion body disease of boid snakes. *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 228-229.
- Jacobson, E.R., Klingenberg, R. J., Homer, B. L. och Mader, D. R. 1999. Inclusion Body Disease. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 9(2): 18-25.
- Jacobson, E.R., Orós, J., Tucker, S. J., Pollock, D. P., Kelley, K. L., Munn, R. J., Lock, B. A., Mergia, A. och Yamamoto, J. K. 2001. Partial characterization of retroviruses from boid snakes with inclusion body disease. *American Journal of Veterinary Research*, 62(2): 217-224.
- Mader, D. R. 1996. *Reptile Medicine and Surgery*. W. B. Saunders Company.
- Raymond, J.T., Garner, M.M., Nordhausen, R.W. och Jacobson, E.R. 2001. A disease resembling inclusion body disease of boid snakes in captive palm vipers (*Boethriechis marchi*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13(1): 82-86.
- Schumacher, J., Jacobson, E. R., Homer, B. L. och Gaskin, J. M. 1994. Inclusion body disease in boid snakes. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 25(4): 511-524.
- Wozniak, E., McBride, J., DeNardo, D., Tarara, R., Wong, V. och Osburn, B. 2000. Isolation and Characterization of an Antigenically Distinct 68-kd Protein from Nonviral Intracytoplasmic Inclusions in Boa Constrictors Chronically Infected with the Inclusion Body Disease Virus (IBDV: Retroviridae). *Veterinary Pathology*, 37: 449-459.